

Aus dem Institut für Transfusionsmedizin - Campus Virchow-Klinikum  
der Medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

# **Particle Gel Immuno Assay (ID-PaGIA) zum Nachweis von anti-IgA Antikörpern**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
**Doctor medicinae (Dr. med.)**

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité -  
Universitätsmedizin Berlin

von  
Kai Oliver Schönhage  
aus Bielefeld

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter:     1. Prof. Dr. med. N. Müller  
                  2. Prof. Dr. med. E. Köttgen  
                  3. Prof. Dr. med. A. Salama

Datum der Promotion: 10. Mai 2005

**WIDMUNG**

**Meinen Eltern Roswitha Kreuer und Hans-Jürgen Schönhage.**

**Für die Standfestigkeit der einen und die Umtriebigkeit des anderen.**

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>WIDMUNG</b>	<b>3</b>
<b><u>1 EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG</u></b>	<b><u>7</u></b>
<b><u>2 GRUNDLAGEN</u></b>	<b><u>8</u></b>
<b>2.1 ANTI-IGA ANTIKÖRPER</b>	<b>8</b>
2.1.1 IMMUNGLOBULINKLASSEN DER ANTI-IGA ANTIKÖRPER	8
2.1.2 PATHOGENESE	9
2.1.3 TRANSFUSIONSREAKTIONEN DURCH IGA	10
2.1.4 ERKRANKUNGEN MIT NACHWEIS VON ANTI-IGA	11
<b>2.2 BISHERIGE TESTMETHODEN ZUM NACHWEIS VON ANTI-IGA ANTIKÖRPERN</b>	<b>12</b>
2.2.1 IGA ALS TESTANTIGEN	12
2.2.2 PASSIVER HÄMAGGLUTINATIONS ASSAY (PHA)	12
2.2.3 ELISA UND RIA	13
<b><u>3 MATERIAL UND METHODEN</u></b>	<b><u>14</u></b>
<b>3.1 LÖSUNGEN</b>	<b>14</b>
3.1.1 LISS	14
3.1.2 AUFBEWAHRUNGSLÖSUNG	14
3.1.3 CHROMCHLORIDLÖSUNG	14
<b>3.2 IMMUNGLOBULINE / ANTIKÖRPER</b>	<b>15</b>
3.2.1 IGA	15
3.2.2 ANTIGLOBULINSEREN	15
<b>3.3 GELKARTENTEST - MICRO-TYPING SYSTEM</b>	<b>16</b>
<b>3.4 PAGIA-BEADS</b>	<b>17</b>
<b>3.5 HERSTELLUNG DER PAGIA-BEADS</b>	<b>18</b>
<b>3.6 HERSTELLUNG DER TESTERYTHROZYTEN</b>	<b>19</b>

3.6.1	NEGATIVKONTROLLEN	19
3.6.2	OPTIMIERUNG DER KOPPLUNG	20
<b>3.7</b>	<b>GEWINNUNG UND AUFBEREITUNG DER SEREN</b>	<b>21</b>
<b>3.8</b>	<b>NACHWEISMETHODEN VON ANTI-IGA ANTIKÖRPERN</b>	<b>22</b>
3.8.1	PRINZIP DES GELKARTENTESTS	22
3.8.2	PARTICLE GEL IMMUNO ASSAY (PAGIA)	23
3.8.3	PASSIVE HÄMAGGLUTINATION (PHA) - GELKARTENTEST	23
3.8.4	PHA – RÖHRCHENTEST	23
3.8.5	IGA-TESTERYTHROZYTEN	24
<b>3.9</b>	<b>BESTIMMUNG DER IMMUNGLOBULINKONZENTRATIONEN</b>	<b>25</b>
3.9.1	TESTPRINZIP	25
<b><u>4</u></b>	<b><u>ERGEBNISSE</u></b>	<b><u>26</u></b>
<b>4.1</b>	<b>IMMUNGLOBULINKONZENTRATIONEN</b>	<b>26</b>
<b>4.2</b>	<b>IGA-KOPPLUNG</b>	<b>26</b>
<b>4.3</b>	<b>NACHWEIS VON ANTI-IGA IM SERUM</b>	<b>27</b>
4.3.1	NORMALSEREN	27
4.3.2	PATIENTENSEREN	29
4.3.3	SPEZIFITÄT	31
4.3.4	VERGLEICH DER METHODEN	31
<b><u>5</u></b>	<b><u>DISKUSSION</u></b>	<b><u>33</u></b>
<b><u>6</u></b>	<b><u>ZUSAMMENFASSUNG</u></b>	<b><u>38</u></b>

<b>ANHANG</b>	<b>40</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>40</b>
<b>DANKSAGUNG</b>	<b>49</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>50</b>
<b>VERÖFFENTLICHUNGEN</b>	<b>51</b>
<b>LEBENS LAUF</b>	<b>52</b>
<b>ERKLÄRUNG AN EIDES STATT</b>	<b>53</b>

## 1 EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Die häufigsten Komplikationen der Bluttransfusionen sind nichthämolytische Reaktionen, von denen ein Teil vermutlich durch anti-IgA Antikörper verursacht wird. Diese Antikörper kommen sowohl im Empfänger- als auch im Spenderplasma vor und sind im allgemeinen gegen alle menschlichen IgA Moleküle (klassenspezifisch) und seltener gegen IgA<sub>1</sub> oder IgA<sub>2</sub> (subklassenspezifisch) gerichtet [1]. Erstere können bei Transfusionen schwere anaphylaktische Reaktionen hervorrufen, während letztere aufgrund ihrer „limitierten Spezifität“ nur nichthämolytische Reaktionen verursachen können [1,2,3,4,5,6,7].

Klassenspezifische anti-IgA Antikörper finden sich häufig im Plasma von Patienten mit selektivem IgA-Mangel (sDIgA - selective Deficiency of IgA) sowie anderen Immunglobulinmangelsyndromen bzw. Immunglobulindefekten (CVID - Common Variable Immuno Deficiency). Sie kommen weitaus seltener als subklassenspezifische anti-IgA Antikörper aber auch bei Menschen mit normalen Immunglobulinkonzentrationen vor [1,3,6,8,9,16].

Eine Untersuchung auf Antikörper gegen IgA wird empfohlen bei unklaren nichthämolytischen Transfusionsreaktionen sowie bei allen Patienten mit IgA-Mangel [10,11].

Zum Nachweis dieser Antikörper wurden bisher drei verschiedene Testverfahren beschrieben [12,13,14]: der ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), der RIA (Radio Immuno Assay) und der passive Hämagglutinationstest (PHT). Diese Methoden sind relativ arbeitsaufwendig, zeigen häufig unspezifische Reaktionen und werden nur in Einzellaboren durchgeführt [12].

In der vorliegenden Arbeit wurde ein einfacher Particle Gel Immuno Assay (ID-PaGIA) entwickelt, mit dem innerhalb von 20 Minuten solche Antikörper spezifisch nachgewiesen werden können.

## 2 GRUNDLAGEN

### 2.1 ANTI-IGA ANTIKÖRPER

Antikörper gegen IgA Moleküle wurden erstmals 1968 im Serum von fünf Patienten mit Ataxia teleangiectatica und IgA-Mangel nachgewiesen [15]. Kurz darauf wurden derartige Antikörper auch im Serum von symptomfreien Personen und auch bei gesunden Menschen gefunden [16]. Es wurde im selben Jahr bei sechs Patienten nachgewiesen, daß diese Antikörper nichthämolytische Transfusionsreaktionen hervorrufen können [1]. Seitdem wurde die Bedeutung von anti-IgA Antikörpern als Ursache für derartige Transfusionsreaktionen von vielen Autoren bestätigt [2,3,4,5,6,7,8,12,17].

#### 2.1.1 Immunglobulinklassen der anti-IgA Antikörper

Anti-IgA Antikörper gehören in den meisten Fällen der IgG und selten auch der IgE-Klasse an. IgG anti-IgA ist hauptsächlich der Subklasse IgG<sub>1</sub> zuzuordnen, aber selten auch den übrigen Subklassen 2, 3 und 4. IgE anti-IgA konnte bisher nur bei gleichzeitigem Vorliegen von anti-IgA Antikörpern einer anderen Immunglobulinklasse nachgewiesen werden und gilt als verantwortlich für besonders schwere Reaktionen [18,19]. Im Serum von Patienten mit IgA Nephritis und rheumatoider Arthritis fanden sich IgA anti-IgA Antikörper [20]. Allerdings schien dort keine typische Antigen-Antikörperbindung vorzuliegen, so daß andere Mechanismen oder Strukturabnormalitäten des Moleküls für das IgA-IgA-Bridging vermutet wurden. Ob durch diese Antikörper anaphylaktische Reaktionen hervorgerufen werden können, ist nicht bekannt.

Bereits 1968 wurden klassenspezifische, gegen alle Formen des IgA-Moleküls gerichtete Antikörper, von „limitiert“ oder subklassenspezifischen, die nur gegen eine der beiden Subklassen IgA<sub>1</sub> oder IgA<sub>2</sub> gerichtet sind, unterschieden [1]. Dabei handelt es sich in den meisten Fällen um anti-IgA<sub>1</sub>. Weiterhin kommen noch allotypenspezifische Antikörper vor, deren Antigen IgA<sub>2m(1)</sub> oder IgA<sub>2m(2)</sub> ist. Die antigenen Determinanten befinden sich auf der  $\alpha$ -Kette des IgA-Moleküls, die die IgA-Subklasse bestimmt. Hieraus ergeben sich die einzelnen Spezifitäten der Antikörper.



Klassenspezifische Antikörper werden für schwere Transfusionsreaktionen im Sinne der Anaphylaxie verantwortlich gemacht und subklassen- und allotypenspezifische für leichtere Formen, wie febrile und urtikarielle Reaktionen. Es sind aber auch Fälle beschrieben, in denen ein subklassenspezifischer Antikörper zu schweren Reaktionen führte [5,6]. Klassenspezifische Antikörper finden sich vorwiegend im Serum von Patienten mit einem absoluten IgA-Mangel ( $<5\text{mg/dl}$ ) unabhängig von weiteren Erkrankungen und subklassenspezifische Antikörper finden sich bei Patienten mit relativem IgA-Mangel ( $5\text{-}700\text{mg/dl}$ ) oder auch bei gesunden Menschen ohne erniedrigte Immunglobulinkonzentrationen [1,6,16]. Es können keine sicheren Aussagen getroffen werden, ob bei bisher asymptomatischen Patienten mit diesen Antikörpern durch wiederholte Transfusionen dennoch Reaktionen neu auftreten können [5,6].

Im Serum von Patienten mit leichten, anaphylaktoiden Reaktionen fanden sich darüber hinaus Antikörper, die nur alteriertes IgA agglutinierten [7]. Es wurde vermutet, daß es sich um Antikörper handelt, deren Antigene durch zuvor vorgenommene Behandlung mit Pepsin bzw. durch lange Lagerung bei  $4^{\circ}\text{C}$  erst freigelegt worden seien. Die klinische Bedeutung dieser Antikörper ist nicht sicher.

### **2.1.2 Pathogenese**

Die Pathogenese der Antikörperbildung ist bisher unklar. In Frage kommt ein Autoimmungeschehen und Alloimmunisierung durch frühere Transfusionen oder Schwangerschaften. Für eine Autoimmunisierung spricht die Tatsache, daß nicht alle Patienten eine Transfusion oder Schwangerschaft in ihrer Anamnese aufweisen [9,21] und anti-IgA Antikörper auch bei Menschen mit normaler IgA-Serumkonzentration vorkommen [1,6,16]. Weiterhin treten sie vorrangig bei Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen auf [22], bei denen sich verschiedene Autoantikörper nachweisen lassen. Hierzu gehören auch Patienten mit einem IgA-Mangel, die oft Rheumafaktoren, Anticardiolipinantikörper und andere Antikörper wie Antiruminantantikörper oder anti-IgG bilden [23]. Außerdem wird auf B-Lymphozyten IgA auch bei IgA-defizienten Patienten exprimiert [24].

Der Mechanismus einer Autoantikörperbildung ist unklar: diskutiert werden Kreuzreaktionen mit durch den Respirations- oder Gastrointestinaltrakt aufgenommenen Antigenen [28], was insbesondere bei Vorliegen eines IgA-Mangels plausibel erscheint. Weitere möglich Ursachen sind mangelnde T-Zell Suppression [29], die zur Erkennung von Serum- oder zellgebundenem IgA als Antigen führt [22] als auch Gewebeschäden durch Immunkomplexe mit Antigenexposition und folgender Antikörperbildung [30].

Gegen eine gehäuft auftretende Sensibilisierung bzw. Bildung von Alloantikörpern spricht die Tatsache, daß Patienten mit Hypogammaglobulinämie trotz der Gabe von IgG-Präparaten, welche immer Reste von IgA enthalten, selten oder keine anti-IgA Antikörper bildeten [25]. Diejenigen Patienten, die bereits vorher klinisch irrelevante Antikörper aufwiesen, zeigten nach der Gabe keine Titerveränderungen. Dieses schließt eine Sensibilisierung jedoch nicht aus [26,27].

### **2.1.3 Transfusionsreaktionen durch IgA**

Bereits nach der Gabe geringer Mengen der Blutprodukten, in denen sich Reste von IgA befinden, kommt es innerhalb von Sekunden bis Stunden zu febrilen Reaktionen, Urtikaria und Erythemen, Vasodilatation und Bronchospasmus im Sinne einer Hypersensitivität vom Typ I. Die Schwere und das Spektrum der Reaktion ist dabei von der Konzentration und Spezifität des Antikörpers abhängig [5,6,8]. Crosslinking von FcεRI und FcεRII gebundenen IgE Molekülen auf der Zellmembran von Mastzellen oder Basophilen führt zu deren Degranulation mit Freisetzung entsprechender Mediatoren (Histamin, Serotonin, Leukotriene, PGE2 etc.). Da anti-IgA Antikörper allerdings überwiegend aus der IgG-Klasse und viel seltener IgE sind (s. 2.1.1), ist unklar wie diese in den meisten Fällen trotzdem zu anaphylaktischen Reaktionen führen können.

Gemessen an allen Gaben von Blutprodukten und der Inzidenz des selektiven IgA-Mangels kommt es insgesamt nur selten zu Reaktionen. Die Angaben in der Literatur zur Inzidenz sind ungenau. Schätzungen gehen von einer Häufigkeit zwischen 1:20.000 und 1:770.000 Transfusionen aus [6,17].

Im Vergleich dazu haben anti-IgA Antikörper bei gesunden Menschen eine Prävalenz von 1:18 bis 1:1.250 [3,8,9] und bei Patienten mit Immundefekten von 20% bis über 80%, abhängig von der Art oder Kombination des Immundefektes [3,8,9,16,19,26,37].

#### **2.1.4 Erkrankungen mit Nachweis von anti-IgA**

Die Antikörper finden sich vorwiegend bei Patienten mit einem selektiven IgA-Mangel, dessen Prävalenz bei 1:500-1:1.200 liegt. Sie kommen bei 16% [31], 28,5% [9], 31% [8], 53,9% [19] bis 63% [32] dieser Patienten vor. Besteht gleichzeitig ein IgG<sub>2</sub>-Mangel, so finden sich anti-IgA Antikörper bei 50% [9] bis 60% der Fälle [19]. Ähnliche Häufigkeiten gelten für weitere Immundefekte wie CVID. Bei Patienten mit Ataxia teleangiectatica wurden anti-IgA Antikörper bei 23% [16] und bei solchen mit gleichzeitigem IgA-Mangel bei 40% [3] nachgewiesen.

Bei Autoimmunerkrankungen in Verbindung mit einem selektivem IgA-Mangel treten die Antikörper sehr häufig auf: in 50% der Patienten mit rheumatoider Arthritis, in 77% mit M. Still und in 100% bei Systemischem Lupus Erythematoses [22].

Auch im Serum völlig gesunder Menschen lassen sich anti-IgA Antikörper nachweisen. Die Angaben über ihre Prävalenz reichen von 0,08% [8] bis 5,6% [9] mit geringerer Prävalenz je größer die untersuchte Anzahl Seren.

Bei Patienten mit IgA-Mangel kommt HLA-A1, -B14 und -DR3 gehäuft vor und zwar unabhängig vom Vorliegen eines anti-IgA Antikörpers. Weiterhin findet sich bei diesen Patienten mit anti-IgA Antikörpern in erhöhtem Maße HLA-DR7 sowie -DR1 bei Patienten ohne anti-IgA Antikörper [33,34].

## **2.2 BISHERIGE TESTMETHODEN zum NACHWEIS von ANTI-IGA ANTIKÖRPERN**

Es gibt zwei unterschiedliche Prinzipien, bei denen die verschiedenen Sub- und Allotypen entweder an Zellmembranen oder inerte Oberflächen aus Kunststoffen gebunden werden, so daß in Serum enthaltene Antikörper je nach Spezifität daran binden können.

### **2.2.1 IgA als Testantigen**

Für die Gewinnung von IgA als Antigen für die Detektion von anti-IgA Antikörpern gibt es zwei Methoden. Die Herstellung aus dem Plasma von Patienten mit Myelomen sichert eine hohe Reinheit und Konzentration. Allerdings wird je Klon nur eine Subklasse bzw. ein Allotyp synthetisiert, so daß das zu untersuchende Serum jeweils einzeln mit jeder Subklasse getestet werden muß. Die IgA Gewinnung aus dem Plasma gesunder Menschen führt zu einem Gemisch aller Subklassen ohne die Möglichkeit der Bestimmung der Subklassenspezifität der anti-IgA Antikörper. Inwieweit die Anteile der IgA-Klassen nach dem Herstellungsprozeß der des nativen Serums entsprechen, bleibt allerdings unklar. Dieser Prozeß ist sehr aufwendig, und das so gewonnene IgA kann noch Reste anderer Immunglobuline enthalten. Es konnte gezeigt werden, daß auch mit ungereinigtem IgA anti-IgA Antikörper mit der passiven Hämagglutination nachgewiesen werden können [13].

### **2.2.2 Passiver Hämagglutinations Assay (PHA)**

Der passive Hämagglutinations Assay (PHA), bei der Erythrozytenmembranen die Oberfläche darstellen, an die das Antigen mit entsprechenden Reagenzien gekoppelt wird, wurde 1967 erstmals beschrieben [35]. Der Nachweis von anti-IgA Antikörpern im Serum gelingt über die sichtbare Agglutination der Erythrozyten nach Mischung mit dem Serum.

Trotz einiger Nachteile, die die Prädiktivität einschränken, wie relativ geringe Reproduzierbarkeit und Titterschwankungen [36] hat die Methode aufgrund ihrer

relativ einfachen Durchführung eine gewisse Verbreitung nach der Modifikation von Vyas und Fudenberg [1] erfahren.

#### **2.2.2.1 Röhrchentest**

In dieser “klassischen“ Methode des PHA wird eine Testerythrozytensuspension mit dem zu untersuchenden Serum in einem Coombs-Röhrchen gemischt, gegebenenfalls inkubiert, dann kurz anzentrifugiert und anschließend muß das Ergebnis, eine eventuelle Agglutination, sofort abgelesen werden. Die Beurteilung ist sehr vom Untersucher abhängig.

#### **2.2.3 ELISA und RIA**

Andere Methoden wie ELISA und RIA, bei denen IgA als Antigen an Kunststoffoberflächen gebunden ist, verwenden enzym- oder radionuklidmarkierte IgA-Moleküle bzw. derartig markierte anti-anti-IgA Antikörper (Sandwich Assays). Somit kann durch die entsprechende Enzym- bzw. Radioaktivität neben dem Nachweis des Antikörpers auch eine Quantifizierung erfolgen. Aufgrund einer bis zu zehnfach höheren Sensitivität gegenüber dem PHA können hier Antikörper nachgewiesen werden, deren Nachweis mit dem PHA-Test nicht gelang [37]. Der große Arbeits- und Zeitaufwand dieser Methoden verhinderte bisher eine weite Verbreitung zur routinemäßigen Bestimmung von anti-IgA Antikörpern.

### **3 MATERIAL UND METHODEN**

#### **3.1 LÖSUNGEN**

##### **3.1.1 LISS**

Zur Herabsetzung des Zetapotentials der Erythrozytenoberfläche und Durchführung des Gelkartentests werden die Testerythrozyten in Diluent 2 (DiaMed AG, Cressier sur Morat, Schweiz), einer mit Trimethoprim und Sulfamethoxazol modifizierten Low Ionic Strength Solution (LISS), aufgeschwemmt.

##### **3.1.2 Aufbewahrungslösung**

Die Testerythrozyten werden in CellStab (DiaMed Ag, Cressier sur Morat, Schweiz), einem Glycin-Kochsalzpuffer, der mit Trimethoprim und Sulfamethoxazol versetzt ist, aufbewahrt.

##### **3.1.3 Chromchloridlösung**

Chromchlorid ist in der Lage, Proteine, hier IgA, unspezifisch auf Zellmembranen zu binden. 1g des Pulvers (Sigma Chemical, St. Louis, USA) wird in 100ml NaCl 0,9% gelöst. Von dieser Stammlösung kann mit NaCl 0,9% eine Konzentration von 0,039µg/µl hergestellt werden [35,36 und eigene Vorversuche].

## **3.2 IMMUNGLOBULINE / ANTIKÖRPER**

### **3.2.1 IgA**

Aus humanem Plasma gewonnenes affinitätsgereinigtes IgA, das ein Gemisch aller Subklassen darstellt (Dako, Carpinteria, USA), wird als Antigen an die Polystyrolbeads bzw. an die Erythrozyten gekoppelt.

Für die Bestimmung der Subklassenspezifität wird affinitätsgereinigtes IgA<sub>1</sub> und IgA<sub>2</sub> (Calbiochem, San Diego, USA) verwendet.

### **3.2.2 Antiglobulinseren**

Mit monoklonalen Antiglobulinseren gegen humanes IgA, IgG und IgM (Biotest AG, Dreieich) wird die Kopplung des IgA an die Polystyrolbeads und Testerythrozyten und die Spezifität der Kopplung überprüft.

### **3.3 Gelkartentest - Micro-Typing System**

Dieses System ermöglicht den Nachweis und die Spezifizierung verschiedener Antikörper gegen Erythrozytenantigene mit praktisch allen Methoden, die auch im klassischen Röhrchentest zur Anwendung kommen. Der wesentliche Vorteil dieser Methode liegt in dem geringen Verbrauch an Zellen und Serum, einer standardisierten Beurteilung und einer höheren Sensitivität und Spezifität [38,39,40,41,42,43,44]. Die Erythrozyten durchwandern eine Gelmatrix, in der sie je nach Stärke der Agglutination weiter oben oder unten bzw. bei keiner Agglutination gar nicht hängenbleiben und als roter Ring sichtbar sind (Abbildung 1, Abbildung 2). Zudem sind die Ergebnisse für eine gewisse Zeit in den Gelsäulen der Karte auch später noch ablesbar und die Handhabung des Systems ist einfach.



### **3.4 PaGIA-BEADS**

Rot eingefärbte Polystyrolpartikel von ca. 3µm Durchmesser und hoher Dichte ( $1,3\text{g/cm}^3$ ), deren physikalische Eigenschaften gegenüber der Matrix des Gelkartentests denen von Erythrozyten entsprechen, dienen als Träger für IgA Moleküle. Sie werden in PBS gepuffert als 0,15%-ige Suspension verwendet [45].

### 3.5 HERSTELLUNG der PaGIA-BEADS

Geeignete synthetische Partikel aus Polystyrol werden mit der Dispersions-Polymerisation hergestellt. Zuerst werden sogenannte Basis-Partikel von 2,3µm Durchmesser synthetisiert, die dann in einem zweiten Schritt durch Copolymerisierung mit Styrol/Bromstyrol zu High-Density Partikeln von 3,1µm Durchmesser und 1,28g/cm<sup>3</sup> Dichte „geschwollen“ werden. Schließlich werden sie mit Sudan IV rot eingefärbt [45,46].

Die Partikel werden nun über mehrere Schritte mit Glutaraldehyd zu Aldehyd-Partikeln funktionalisiert. Danach werden sie über ebenfalls mehrere Schritte mit Streptavidin behandelt (streptavidinisiert). Die Partikel werden dann mit biotinylierten Antikörpern inkubiert. Abschließend werden die Partikel gewaschen und mit PBS zu einer gebrauchsfertigen 0,15%-igen Lösung suspendiert [45,46]. Zur Erleichterung der Arbeit wurden die Beads von der Firma DiaMed AG (Cressier sur Morat, Schweiz) bestellt und mit den gewünschten Antikörpern beladen (ge-coated) und für die Lagerung stabilisiert.

### 3.6 HERSTELLUNG der TESTERYTHROZYTEN

Von ca. sieben Tage alten Erythrozytenkonzentraten der Blutgruppe 0 Rhesus (D) negativ werden ca. 500µl viermal mit NaCl 0,9% gewaschen. Die Erythrozyten werden bei 3.000 UpM für fünf Minuten zentrifugiert, der Überstand mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt und das Sediment in der isotonischen Kochsalzlösung resuspendiert. Nach dem Waschen wird das Sediment mit NaCl 0,9% 1:1 suspendiert.

In einem 10ml Glasröhrchen werden 250µl IgA-Lösung (mit NaCl 0,9% auf 0,65µg/µl eingestellt) mit 500µl der Erythrozytensuspension durchmischt und dazu 2,5ml der Chromchloridlösung (0,039µg/µl) gegeben. Das Röhrchen wird sofort kräftig geschüttelt und für 25 Minuten bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Anschließend werden die beladenen Zellen wie zuvor viermal mit NaCl 0,9% gewaschen. Zum Nachweis einer stattgefundenen IgA-Kopplung und zum Ausschluß einer Kopplung anderer Immunglobuline aus Verunreinigungen des kommerziellen IgA werden direkte Antiglobulinteste (DAT) in der Gelkarte mit anti-IgA, anti-IgG und anti-IgM durchgeführt. Die beladenen Erythrozyten werden nun zur Aufbewahrung in CellStab suspendiert und bei 4°C wenige Tage aufbewahrt.

Zum Gebrauch in der Gelkarte werden die Testerythrozyten erneut in NaCl 0,9% gewaschen und mit Diluent 2 zu einer 1%-igen Lösung suspendiert. In dieser Lösung können sie einige Tage aufbewahrt werden, bevor der Überstand hämolytisch wird und die gewaschenen Erythrozyten deutlich vermehrt agglutinieren.

#### 3.6.1 Negativkontrollen

Auf dieselbe Weise wie oben beschrieben werden Erythrozyten desselben Spenders nur mit Chromchlorid inkubiert, gewaschen und aufbewahrt. Hierzu genügt etwa ein Fünftel bis ein Zehntel obiger Menge. Ein weiterer Teil derselben Erythrozytencharge als unbehandelte Negativkontrolle wird nur gewaschen und in CellStab aufbewahrt bzw. zur Testung in Diluent 2 1%-ig suspendiert.

### 3.6.2 Optimierung der Kopplung

Da verschiedene Arbeitsanleitungen [36,47] zur unspezifischen Beladung in der Literatur beschrieben sind, wurde durch Titerreihen mit Seren gesunder Spender eine optimale Konzentration aller Reagenzien gesucht, bei der die Testerythrozyten weder spontan noch durch normale Seren agglutinieren. Die Chromchloridkonzentration ist maßgebend und muß niedrig sein. Es darf nur kurz mit Erythrozyten durchgemischt werden. Nichtbeachtung dessen führt zu Spontanhämolysen und -agglutinationen sowie zu mangelnder oder fehlender Kopplung.

Die Konzentrationen der Erythrozyten und des IgA sind zweitrangig, solange genügend IgA-Moleküle zur Verfügung stehen. Allerdings spielt das Alter der Erythrozyten eine wichtige Rolle, da ganz frische Erythrozyten fast immer spontan während der Kopplung agglutinierten und zu alte (>10 Tage) stets beim Waschen zu einem Großteil lysierten.

Trotz optimaler Herstellung sind die Testerythrozyten in vielen Fällen nur zwei Tage sicher zu verwenden. Einige Chargen zeigten auch nach sieben Tagen keine Spontanagglutinationen. Allerdings zeigen solche Erythrozyten meistens Hämolysen.

Einige Chargen wurden an verschiedenen Tagen mit denselben Seren inkubiert und zeigten verschiedene Titer. Dieses gilt sowohl für unspezifische Reaktionen mit Seren gesunder Spender als auch für Seren von Patienten mit anti-IgA Antikörpern. Die Schwankungen der Titerstufen bei der Verwendung von Testerythrozyten war nicht vermeidbar. Dadurch können auch falsch positive Reaktionen resultieren.

Die Seren gesunder Blutspender zeigten praktisch immer Agglutinationen mit Testerythrozyten. Die Reaktionen waren variabel (Titerstufen von 1:1 bis 1:80).

### 3.7 GEWINNUNG und AUFBEREITUNG der SEREN

Geronnenes Nativblut von Patienten aus der Blutspenderoutine des Virchow Klinikums wird fünf Minuten bei 3.000 UpM zentrifugiert und das abgetrennte Serum sodann in Eppendorfhütchen pipettiert. Die Lagerung des Serums erfolgt bei -30°C. Bei Bedarf läßt es sich auftauen und bei 4°C einige Tage aufbewahren.

Die Seren der IgA defizienten Patienten stammen aus eingefrorenen Beständen des Zentrallabors Bern des Schweizer Roten Kreuzes (ZLB SRK, Frau R. Krieg) und des Virchow Klinikums.

Die Antikörper werden in einer geometrischen Verdünnungsreihe der Seren ermittelt. Diese werden dazu jeweils 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 usw. mit NaCl 0,9% verdünnt, indem 200µl Kochsalzlösung in ein Glasröhrchen vorgelegt werden und aus der vorhergehenden Verdünnungsstufe dieselbe Menge hineinpipettiert und gemischt wird. Zur Antikörpersuche ist eine Reihe bis 1:64 in der Regel ausreichend. Bei Nachweis eines anti-IgA Antikörpers kann die Verdünnungsreihe fortgeführt werden.

Um unspezifische Reaktionen mit Serum auszuschließen, wurde jede neue Charge Testerythrozyten mit Seren gesunder Blutspender des jeweiligen Tages getestet. Auch hier wurde - wie oben beschrieben - eine Verdünnungsreihe bis 1:64 angefertigt.

### 3.8 NACHWEISMETHODEN von ANTI-IGA ANTIKÖRPERN

#### 3.8.1 Prinzip des Gelkartentests

Die ID-Gelkarten (DiaMed AG, Cressier sur Morat, Schweiz) werden seit einigen Jahren routinemäßig in der Blutgruppenserologie verwendet.



Abbildung 1: Nachweis von IgA auf Erythrozyten / Gelmatrix mit Agglutinen

Eine Karte enthält sechs trichterförmige Vertiefungen, an die sich die aus Sephadex, einem Dextrangel, bestehenden Gelsäulen anschließen (Abbildung 1). Das Gel kann auf Kochsalzbasis neutral oder mit unterschiedlichen Antikörpern (Coombskarte) oder Reagenzien entsprechend der Fragestellung präpariert werden. Die Antigenträger, Beads oder Erythrozyten, werden als Suspension in die Vertiefungen pipettiert und anschließend das Serum dazugegeben. Nach einer bestimmten Inkubationszeit wird die Karte 10 Minuten bei 980 UpM (80g) in der Kartenzentrifuge der Firma DiaMed zentrifugiert. Agglutinate können die Gelmatrix je nach ihrer Größe nur teilweise oder gar nicht durchwandern, während nicht agglutinierte Beads oder Erythrozyten bis auf den Boden der Säule gelangen. Starke Antigen-Antikörperreaktionen zeigen sich durch einen roten Ring im oberen Bereich der Gelsäule und fehlende Reaktionen durch einen roten Bodensatz. Mischagglutinationen ergeben ein je nach Stärke unterschiedliches Verteilungsmuster innerhalb der Gelsäule.

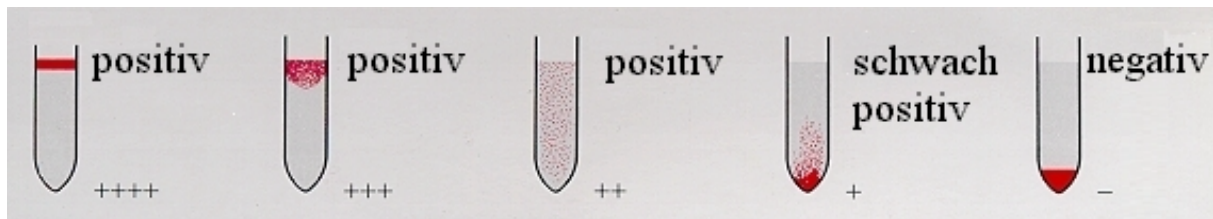


Abbildung 2: Schema der Reaktionsmuster im Gelkartentest

Zum Nachweis von anti-IgA Antikörpern im Plasma oder Serum wurden IgA beladene Erythrozyten oder Beads verwendet.

### 3.8.2 Particle Gel Immuno Assay (PaGIA)

Je Säule werden 10µl Serum in die Vertiefung pipettiert und anschließend 20µl der gebrauchsfertigen Partikelesuspension hinzugefügt. Nach 5 Minuten Inkubationszeit wird die Karte wie oben beschrieben zentrifugiert. Die verwendete Karte ist speziell den Beads, die kleiner als Erythrozyten sind, angepaßt.

### 3.8.3 Passive Hämagglutination (PHA) - Gelkartentest

50µl der Testerythrozytensuspension werden in jede Säule einer Coombskarte pipettiert und danach 25µl Serum hinzugefügt. Nach 15 Minuten Inkubationszeit wird die Gelkarte entsprechend zentrifugiert.

Bei den untersuchten Seren wird jeweils eine Negativkontrolle zum Ausschluß antierythrozytärer Antikörper, die falsch positive Agglutinationen hervorrufen können, mit unbehandelten Erythrozyten und zum Ausschluß unspezifischer Reaktionen eine weitere mit Chromchlorid-behandelten Erythrozyten desselben Spenders durchgeführt. 50µl der Erythrozytensuspension werden mit 25µl des Serums inkubiert und zentrifugiert. Bei einer Agglutination sind positive Ergebnisse der Testerythrozyten nicht zu verwerten, und der Nachweis von anti-IgA Antikörpern muß mit Testerythrozyten eines anderen Spenders wiederholt werden.

### 3.8.4 PHA – Röhrchentest

50µl der Testerythrozytensuspension werden mit 100µl Serum und einem Tropfen Coombsserum in einem Coombsröhrchen gemischt und anschließend 15 Sekunden zentrifugiert. Das Röhrchen wird unmittelbar danach über einer Lichtplatte schräg

gehalten und leicht gegen diese geklopft, um eventuell im Sediment vorhandene Agglutinate sichtbar zu machen. Positive Reaktionen sind nur kurze Zeit eindeutig ablesbar. Wie beim Gelkartentest müssen die entsprechenden Negativkontrollen mitgeführt werden.

### **3.8.5 IgA-Testerythrozyten**

Die Kopplung an die Testerythrozyten gelingt nicht immer sicher, da die behandelten Erythrozyten relativ häufig spontane Agglutinationen zeigen. Deshalb wird ein direkter Antiglobulintest mit je einem monoklonalen Antiglobulinserum gegen IgA, IgG und IgM sowie eine Negativkontrolle mit NaCl 0,9% durchgeführt. Auch hier werden 50µl der Erythrozytensuspension in jede Vertiefung pipettiert und 25µl des unverdünnten Antiglobulinserums bzw. NaCl 0,9% hinzugefügt, 10 Minuten inkubiert und zentrifugiert.

Die Gelsäule mit anti-IgA muß ein 4-fach positives Ergebnis (+++++) aufweisen, während die drei Säulen mit anti-IgG, anti-IgM und NaCl 0,9% keine Reaktionen (-) zeigen dürfen. Sollte diese Konstellation nicht erzielt werden, so darf die Charge nicht verwendet werden.

Da es auch durch Seren ohne anti-IgA Antikörper zu unspezifischen Reaktionen kommen kann, wird zum Ausschluß bzw. zur Einschätzung derselben sowohl jede neue Charge als auch nur mit Chromchlorid-behandelte Erythrozyten mit sechs bis acht unverdünnten Seren gesunder Blutspender inkubiert. Bei positiven Reaktionen wird dann der Titer ermittelt. Gleichzeitig muß eine Negativkontrolle mit unbehandelten Erythrozyten der Charge zum Ausschluß eventuell vorhandener antierythrozytärer Antikörper mitgeführt werden. 50µl der jeweiligen 1%-igen Erythrozytensuspension werden in die Vertiefung pipettiert und 25µl des Serums dazugegeben. Nach 10 Minuten Inkubation wird die Karte zentrifugiert und anschließend das Ergebnis abgelesen.



### 3.9 BESTIMMUNG der IMMUNGLOBULINKONZENTRATIONEN

Zur quantitativen Bestimmung der Immunglobuline IgA, IgG und IgM im Serum durch Immunturbidimetrie wurde das Modular Gerät von Hitachi des Zentrallabors des Virchow-Klinikums verwendet (Dr. med. Müller - Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie, Direktor: Prof. Dr. med. E. Köttgen).

#### 3.9.1 Testprinzip

Der Serumprobe werden Antikörper gegen das zu bestimmende Immunglobulin zugegeben, so daß die entstehenden Antigen-Antikörper-Komplexe kolloidal verteilt sind. Anhand der Extinktion des durchtretenden Lichts kann anhand des Lambert-Beer-Gesetzes ( $E=d \cdot \varepsilon \cdot C$ ) die Konzentration des Immunglobulins errechnet werden. Die Messung erfolgt mit den Wellenlängen 340 nm und 700 nm.

Ca. 100µl des Serums werden in eine spezielle Küvette pipettiert und in dem Gerät vollautomatisch aufbereitet und untersucht.

	Meßbereich	Referenzbereich
<b>IgA</b>	0,00 - 10,00	0,70 - 4,00
<b>IgG</b>	0,00 - 40,00	7,00 - 16,00
<b>IgM</b>	0,00 - 5,00	0,40 - 2,30

Tabelle 1: Meßbereiche und Normalwerte (g/l) für IgA, IgG und IgM

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Immunglobulinkonzentrationen

In allen untersuchten Seren wurde die Konzentration von IgA, IgG und IgM bestimmt (Immunturbidimetrie, 3.9). Die Seren gesunder Blutspender wiesen vom Normbereich keine abweichenden Konzentrationen auf (Tabelle 3). Hingegen zeigten die nachuntersuchten Seren von Patienten mit IgA-Mangel und CVID starke Verminderung der IgA- bzw. der Immunglobulinkonzentrationen (Tabelle 4). Bei zwei Seren (##1,4) konnten die Immunglobuline wegen Materialmangels nicht bestimmt werden.

### 4.2 IgA-Kopplung

Zum Nachweis einer spezifischen IgA-Kopplung an die Beads und Erythrozyten wurden alle Chargen der PaGIA Beads und behandelten Testerythrozyten mit Antiglobulinseren bzw. NaCl (0,9%) im Gelkartensystem untersucht.

Alle untersuchten Chargen reagierten spezifisch mit anti-human-IgA. Anti-human-IgG und -IgM sowie NaCl führten in keinem Fall zu einer Agglutination der Beads oder Erythrozyten. Die Reaktionen im PHA waren insgesamt hier deutlich stärker als die Reaktionen im PaGIA (Tabelle 2).

Methode	anti-IgA	anti-IgG	anti-IgM	NaCl
<b>PaGIA</b>	1:320	-	-	-
<b>PHA</b>	1:5.120	-	-	-

Tabelle 2: Reaktivität der Antiglobulinseren mit den Beads und IgA-Testerythrozyten

### 4.3 NACHWEIS von Anti-IgA im Serum

#### 4.3.1 Normalseren

Es wurden insgesamt 105 Seren gesunder Blutspender aus der Blutspenderoutine des Virchow-Klinikums in einer Titrationsreihe (unverdünnt, 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80) mit den IgA-beladenen Erythrozyten im passiven Hämagglutinationsassay (PHA) im ID-Micro Typing System und mit dem PaGIA getestet. Während im PHA 70 Seren zu einer Agglutination der Testerythrozyten führten (Titer 1:1 - 1:80), ließen sich im PaGIA keine positiven Reaktionen nachweisen. Die Kontrollen auf antierythrozytäre Antikörper in den Spenderseren mit unbehandelten Erythrozyten derselben Chargen waren stets negativ. Daher sind die positiven Reaktionen im PHA offensichtlich unspezifisch und können durch eine spontane Agglutination der behandelten Erythrozyten erklärt werden.

Tabelle 3: Immunglobulinkonzentrationen (g/l) und Reaktionen der normalen Serumproben

#	PaGIA	PHA	IgA	IgG	IgM
1	-	1:80	1,54	8,63	1,52
2	-	1:10	2,67	11,27	1,76
3	-	1:5	2,94	9,91	0,79
4	-	1:5	1,22	7,54	1,11
5	-	1:20	3,51	14,07	1,89
6	-	1:10	1,81	9,20	2,31
7	-	1:5	1,29	12,56	1,84
8	-	1:5	2,50	8,46	2,02
9	-	1:5	0,93	12,93	1,41
10	-	1:5	3,37	10,71	0,99
11	-	1:1	1,85	9,56	1,74
12	-	-	2,33	11,44	1,21
13	-	-	2,74	10,79	2,07
14	-	1:20	1,53	10,26	1,58
15	-	1:20	1,32	8,66	0,51
16	-	1:5	2,05	12,81	1,73
17	-	-	0,86	11,92	0,74
18	-	1:80	1,10	7,37	1,93

#	PaGIA	PHA	IgA	IgG	IgM
19	-	1:1	2,27	14,84	1,85
20	-	1:20	1,66	11,643	2,27
21	-	-	2,19	8,16	1,46
22	-	1:10	1,28	13,52	0,87
23	-	1:1	3,37	11,41	2,06
24	-	1:40	1,01	7,99	1,88
25	-	1:1	2,05	10,51	1,11
26	-	-	1,79	10,82	1,90
27	-	1:1	2,94	15,40	1,32
28	-	1:20	1,59	10,52	0,47
29	-	1:5	1,18	11,04	1,61
30	-	1:10	2,13	9,87	1,22
31	-	1:10	0,99	7,21	1,82
32	-	1:5	1,23	12,22	0,99
33	-	-	1,60	9,64	1,63
34	-	1:40	2,74	8,82	1,31
35	-	-	1,73	13,71	0,61
36	-	1:1	0,95	10,51	1,97

#	PaGIA	PHA	IgA	IgG	IgM
37	-	1:5	2,37	11,24	1,00
38	-	-	1,41	10,84	1,25
39	-	-	1,56	10,00	0,93
40	-	-	3,02	9,44	2,11
41	-	1:5	1,34	10,13	1,29
42	-	1:10	1,35	8,86	1,22
43	-	-	1,27	8,42	1,74
44	-	1:1	1,26	7,75	0,85
45	-	-	2,67	11,73	1,19
46	-	1:1	1,00	12,30	1,14
47	-	-	2,52	10,30	1,50
48	-	-	2,34	10,81	1,14
49	-	1:1	1,23	7,44	1,09
50	-	-	1,64	9,07	2,17
51	-	-	1,66	11,45	0,82
52	-	1:10	2,46	10,99	0,93
53	-	1:1	1,03	10,73	1,06
54	-	-	1,76	10,17	0,80
55	-	-	1,64	10,98	1,28
56	-	1:1	1,23	8,48	0,73
57	-	-	2,34	9,53	0,64
58	-	1:1	1,81	10,09	0,94
59	-	-	1,36	8,75	1,12
60	-	-	1,06	15,15	1,29
61	-	1:5	3,30	13,42	0,67
62	-	-	1,55	10,12	0,91
63	-	-	0,67	8,34	1,10
64	-	-	1,53	11,01	0,87
65	-	-	1,51	8,58	1,05
66	-	1:5	2,55	11,06	1,30
67	-	1:10	0,99	10,03	1,06
68	-	1:1	1,04	10,08	1,16
69	-	1:20	0,96	13,30	0,88
70	-	1:5	2,30	8,85	0,50
71	-	1:5	1,08	7,95	1,06
72	-	1:10	3,98	11,97	1,01
73	-	1:20	1,15	11,66	0,76

#	PaGIA	PHA	IgA	IgG	IgM
74	-	1:10	1,23	9,19	0,30
75	-	1:10	0,61	7,41	0,99
76	-	-	2,76	10,36	0,50
77	-	-	1,71	12,33	1,03
78	-	1:5	1,39	15,62	1,83
79	-	1:80	2,07	14,05	1,77
80	-	-	1,50	10,17	1,07
81	-	1:20	1,08	7,12	0,96
82	-	1:1	2,17	11,04	0,67
83	-	1:20	2,75	10,48	0,81
84	-	1:5	2,17	9,55	1,36
85	-	1:1	1,83	11,10	0,77
86	-	1:5	2,50	11,19	0,85
87	-	1:1	2,50	10,66	1,13
88	-	1:1	3,99	10,21	0,78
89	-	1:10	1,88	10,24	0,87
90	-	1:1	2,09	13,61	0,95
91	-	1:40	1,71	10,05	0,99
92	-	-	2,32	10,54	0,75
93	-	-	1,49	10,96	0,61
94	-	1:20	2,13	12,11	0,98
95	-	-	1,10	7,65	1,12
96	-	-	1,87	12,30	0,57
97	-	1:1	1,79	10,95	0,41
98	-	1:1	2,26	16,95	1,22
99	-	1:5	1,62	9,03	0,70
100	-	-	3,50	9,72	0,52
101	-	-	2,70	10,53	0,83
102	-	-	1,74	8,98	1,72
103	-	1:5	1,53	14,06	0,89
104	-	1:5	2,74	11,83	0,53
105	-	1:5	2,09	10,89	1,01

### 4.3.2 Patientenseren

Insgesamt wurden 34 Seren von Patienten mit bekanntem IgA-Mangel bzw. CVID untersucht (Tabelle 4). Bei elf dieser Seren lag ein selektiver IgA-Mangel vor und bei den übrigen 23 variable Immundefekte (CVID) mit zusätzlicher Erniedrigung der Immunglobulinklassen IgG und/oder IgM. Wegen Materialmangels konnten die Bestimmungen der Immunglobulinkonzentrationen der Seren ##1 und 4 mit der Diagnose sDIgA in dieser Arbeit nicht durchgeführt werden. Eine Patientin (#1) hatte eine anaphylaktische Reaktion nach Gabe von anti-Rh(D).

ID#	w/m	Alter	IgA	IgG	IgM	Diagnose	PaGIA	PHA	Ig-Gabe
1	W	34	n.u.	n.u.	n.u.	sDIgA	1:256	1:512	anti-Rh
2	W	49	0,00 ↓	25,31 ↑	4,55 ↑	sDIgA	1:80	>1:2560	i.v. IgG
3	W	31	0,00 ↓	17,63 ↑	1,09	sDIgA	1:4	1:128	i.v. IgG
4	W	50	n.u.	n.u.	n.u.	sDIgA	1:32	1:64	i.v. IgG
5	W	53	0,06 ↓	10,59	0,20 ↓	CVID	1:32	1:64	i.v. IgG
6	n.b.	n.b.	0,08 ↓	5,12 ↓	0,23 ↓	CVID	1:32	1:320	i.v. IgG
7	M	42	0,00 ↓	5,53 ↓	0,54	CVID	1:8	1:32	i.v. IgG
8	n.b.	n.b.	0,03 ↓	12,50	0,21 ↓	CVID	1:32	1:32	i.v. IgG
9	W	12	0,00 ↓	15,79	0,87	sDIgA	1:4	1:20	i.v. IgG
10	W	55	0,01 ↓	4,60 ↓	0,30 ↓	CVID	1:2	1:5	i.v. IgG
11	W	9	0,00 ↓	14,72	0,44	sDIgA	-	1:1	i.v. IgG
12	M	32	0,37 ↓	11,52	0,81	sDIgA	-	-	i.v. IgG
13	W	54	0,00 ↓	3,86 ↓	0,08 ↓	CVID	-	-	i.v. IgG
14	M	1	0,44 ↓	7,59	0,42	sDIgA	-	-	i.v. IgG
15	W	44	0,75 ↓	4,08 ↓	0,33 ↓	CVID	-	-	i.v. IgG
16	W	49	0,02 ↓	3,93 ↓	5,68 ↑	CVID	-	-	i.v. IgG
17	W	29	0,35 ↓	12,36	3,21 ↑	sDIgA	-	-	i.v. IgG
18	M	11	0,01 ↓	5,04 ↓	0,27 ↓	CVID	-	-	i.v. IgG
19	W	13	0,40 ↓	9,74	2,77 ↑	sDIgA	-	-	i.v. IgG
20	M	15	0,01 ↓	22,97 ↑	0,04 ↓	CVID	-	-	i.v. IgG
21	n.b.	n.b.	0,10 ↓	38,61 ↑	0,05 ↓	CVID	-	-	i.v. IgG
22	n.b.	n.b.	0,16 ↓	4,22 ↓	1,76	CVID	-	-	i.v. IgG
23	n.b.	n.b.	0,61 ↓	29,81 ↑	0,14 ↓	CVID	-	-	i.v. IgG
24	n.b.	n.b.	0,00 ↓	0,00 ↓	0,00 ↓	CVID	-	-	i.v. IgG
25	n.b.	n.b.	0,00 ↓	6,70 ↓	0,39 ↓	CVID	-	-	i.v. IgG

ID#	w/m	Alter	IgA	IgG	IgM	Diagnose	PaGIA	PHA	Ig-Gabe
26	n.b.	n.b.	0,03 ↓	3,31 ↓	0,02 ↓	CVID	-	-	i.v. IgG
27	n.b.	n.b.	0,00 ↓	7,79	1,93	sDIgA	-	-	i.v. IgG
28	n.b.	n.b.	0,02 ↓	5,65 ↓	0,06 ↓	CVID	-	-	i.v. IgG
29	n.b.	n.b.	0,41 ↓	5,83 ↓	1,39	CVID	-	-	i.v. IgG
30	n.b.	n.b.	0,00 ↓	21,79 ↑	0,02 ↓	CVID	-	-	i.v. IgG
31	n.b.	n.b.	0,71 ↓	24,99 ↑	0,30 ↓	CVID	-	-	i.v. IgG
32	n.b.	n.b.	0,00 ↓	3,41 ↓	0,00 ↓	CVID	-	-	i.v. IgG
33	n.b.	n.b.	0,12 ↓	2,34	0,05 ↓	CVID	-	-	i.v. IgG
34	n.b.	n.b.	0,01 ↓	0,00 ↓	0,00 ↓	CVID	-	-	i.v. IgG

Tabelle 4: Immunglobulinkonzentration (g/l) und Reaktionen der Serumproben von Patienten mit IgA-Mangel bzw. CVID (n.b.: nicht bekannt; n.u.: nicht untersucht; ↓/↑: unter-/oberhalb Normalbereich)

Von den untersuchten Serumproben zeigten 10 Seren positive Reaktion sowohl im PaGIA als auch im PHA (##1-10). Die Titer der Antikörper waren im PaGIA stets kleiner als im PHA. Außerdem führte ein Serum (#11) nur im PHA zu einer positiven Reaktion. Die übrigen Seren (##12-34) zeigten weder mit Beads noch mit Testerythrozyten Reaktionen. Somit handelt es sich bei den positiven Reaktionen eindeutig um spezifische Reaktionen gegen IgA-Moleküle.

Von den zehn positiv getesteten Seren waren fünf von den Patienten mit sDIgA (##1-4 und 9) und fünf mit der Diagnose CVID (##5-8 und 10). Hiermit beträgt die Prävalenz der anti-IgA Antikörper bei sDIgA 45% (5/11) und bei CVID 22% (5/23). Dabei fanden sich bei Patienten mit sDIgA Antikörper mit höheren Titern als bei solchen mit CVID. Die Titer blieben über mehrere Monate mit allen getesteten Serumproben (##4,5,7 und 10) und derselben Charge der Beads konstant (Tabelle 5) während im PHA teilweise innerhalb desselben Tages Schwankungen von ein bis zwei Stufen der Verdünnungsreihe (z.B. 1:8/1:16/1:32) beobachtet werden konnten. Die Titer in Tabelle 4 sind die vom 15.02.00.

#	31.8.99	29.01.00	15.02.00
4	1:32	1:32	1:32
4	1:32	1:32	1:32

#	31.8.99	29.01.00	15.02.00
7	1:8	1:8	1:8
10	1:2	1:2	1:2

Tabelle 5: Titer im PaGIA von 8/99 bis 2/00

Eine Gegenüberstellung der positiven und negativen Ergebnisse beider Methoden bei Gesunden und Patienten ist in Tabelle 6 dargestellt.

Serum	Anzahl	PaGIA positiv/negativ	PHA
Blutspen-	105	0/105	70/35
Patienten	34	10/24	11/23

Tabelle 6: positive und negative Reaktionen der beiden Testmethoden

#### 4.3.3 Spezifität

Die Patientenseren ##1,2,7,8 wurden mit einem für anti-IgA<sub>1</sub> oder anti-IgA<sub>2</sub> spezifischen PaGIA in einer ersten Testreihe auf ihre Spezifität und Höhe des jeweiligen Titers hin untersucht. Alle vier Seren hatten klassenspezifische anti-IgA Antikörper. Für Untersuchungen weiterer Seren standen nicht genügend Serum-mengen zur Verfügung.

#	IgA	IgA1	IgA2
1	1:256	1:256	1:256
2	1:128	1:128	1:128
7	1:8	1:32	1:32
8	1:4	1:4	1:8

Tabelle 7: Spezifität und Titer der Antikörper (PaGIA)

#### 4.3.4 Vergleich der Methoden

Zum Vergleich wurden die Testerythrozyten im Röhrchentest mit vier Seren von gesunden Blutspendern aus der Blutspenderoutine und mit elf Patientenseren mit

anti-IgA Antikörpern untersucht (Tabelle 8). Die Reaktionen waren erwartungsgemäß im Gelkartentest stärker als im Röhrchentest. Im PaGIA zeigten die negativen Seren keine Positivität und positive Seren eher schwächere Reaktionen.

Typ	Serum #	PaGIA	PHA	Röhrchen
<b>monoklonal</b>	anti-IgA	1:320	1:5.120	1:1.280
"	anti-IgG	-	-	-
"	anti-IgM	-	-	-
<b>Blutspender</b>	A1 Rh neg.	-	-	-
"	B Rh pos.	-	-	-
"	0 Rh pos.	-	-	-
"	AB Rh pos.	-	1:20	-
<b>Patienten</b>	1	1:256	1:512	1:256
"	2	1:80	1:2560	1:1.000
"	3	1:4	1:128	1:8
"	4	1:32	1:64	1:32
"	5	1:32	1:64	1:32
"	6	1:32	1:320	n.u.
"	7	1:8	1:32	1:16
"	8	1:4	1:32	1:16
"	9	1:4	1:20	1:8
"	10	1:2	1:5	1:2
"	11	-	1:1	-

Tabelle 8: Vergleich der Methoden



## 5 DISKUSSION

Die am meisten gefürchtete nichthämolytische Transfusionsreaktion ist die Anaphylaxie. Bisher wurden als Ursache für diese Reaktion meistens Antikörper gegen IgA-Moleküle vermutet [2,3,4,5,6,7,8,12,17]. Die bisherigen Testmethoden zum Nachweis der ursächlichen Antikörper sind jedoch nicht standardisiert und können nur in wenigen Untersuchungszentren durchgeführt werden. Außerdem ist die genaue Inzidenz dieser Reaktionen völlig unbekannt [6,17]. Dennoch werden in manchen internationalen, aber auch nationalen Zentren (Deutsches Rotes Kreuz) Personen mit selektivem IgA-Mangel registriert und als Blutspender für Patienten mit IgA-Mangel bestimmt. Dementsprechend sollen die betroffenen Patienten gegebenenfalls auch prophylaktisch nur IgA-freie Blutprodukte erhalten und zwar unabhängig davon, ob sie anamnestisch Reaktionen auf die Gabe von Blutprodukten gezeigt haben oder in ihren Seren anti-IgA nachweisbar ist. Die Begründung hierfür beruht auf der Vermutung, daß Personen mit IgA-Mangel durch die Gabe von IgA-haltigen Blutprodukten immunisiert werden können und bei einer Immunisierung eine unerwünschte Transfusionsreaktion provoziert wird [5,6,8]. Gelegentlich werden den betroffenen Patienten sogar notwendige Therapien vorenthalten, um die vermutlichen Komplikationen zu vermeiden. Abgesehen von Bluttransfusionen werden offensichtlich auch viele symptomatische Patienten mit Antikörpermangel nicht mit IgG-Immunglobulinen substituiert, da diese Präparate auch geringe Mengen IgA enthalten.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen praktischen Test zum Nachweis von anti-IgA Antikörpern zu entwickeln, da der bisher am häufigsten verwendete PHA häufig unspezifische und nicht reproduzierbaren Ergebnisse zeigt [36]. Wie auch in dieser Arbeit gezeigt wurde, reagieren nach der Chromchlorid-Methode die meisten Normalseren mit IgA-beladenen Erythrozyten. Die Reaktionsstärke der Normalseren ist sehr variabel und einzelne Seren reagieren bis zu einer Verdünnung von 1:80. Somit kann trotz der zahlreichen experimentellen Versuche in der vorliegenden Arbeit anhand des PHA häufig keine aussagekräftige Entscheidung getroffen werden, ob die nachgewiesene Reaktionen in Wirklichkeit klinisch rele-

vant sind oder nicht. IgA Antikörper kommen auch bei gesunden Menschen vor, wobei deren Prävalenz in Studien mit großer Zahl untersuchter Seren bei 1:18 bis 1:1,25 liegt [3,8,9]. Die Wahrscheinlichkeit für ein richtig positives Ergebnis von 70 positiven bei 105 untersuchten Seren ist damit relativ gering.

Die unterschiedlichen Ergebnisse mit großer Diskrepanz zwischen PHA und PAGIA bei Normalseren und sehr gute Übereinstimmung beider Tests bei Patientenserren sind nur schwer zu interpretieren. Die Patientenserren wurden am Ende der Arbeit getestet. Ob routinierteres und präziseres Herstellen und Aufbewahren der Testerythrozyten oder verschiedene Chargen von IgA zu weniger falsch positiven Reaktionen führte, läßt sich nur spekulieren.

Der in dieser Arbeit neu entwickelte Test ist einfach durchführbar und erlaubt einen schnellen und spezifischen Nachweis von anti-IgA Antikörpern. Obwohl der neue Test an dem PHA adaptiert wurde, ließen sich keine Unspezifitäten im neuen Test feststellen. Alle Serumproben von gesunden Blutspendern waren negativ. Im Vergleich dazu zeigten Coombsseren (anti-IgG, anti-IgM und anti-IgA) positive Reaktionen nur mit anti-IgA (Tabelle 3, Tabelle 4 und Tabelle 8). Somit ist die Spezifität des neuen Tests gegeben. Um die Sensitivität zu untersuchen, wurden anti-IgA-haltige Seren mit verschiedenen IgA-Mengen in 5-80 ng/ml inkubiert. Dieser Inhibitionsversuch zeigte, daß die Sensitivität des neuen Tests zwischen 15 und 20 ng/ml liegt [25]. Die optimale Sensitivität für die Erfassung von nur klinisch relevanten Antikörpern muß anhand der Untersuchungen von entsprechenden Seren festgestellt werden. Leider sind klinisch relevante Antikörper gegen IgA-Moleküle sehr selten und es fanden sich in großen Zentren keine verfügbaren Seren von betroffenen Patienten. Dieses ist allerdings nicht nur auf die Seltenheit der Antikörper zurückzuführen, sondern auch auf die Tatsache, daß die Seren betroffener Patienten in der Regel nicht danach untersucht werden [10,11]. Es wird gehofft, daß die Erfassung dieser Fälle nach der Einführung des neuen Tests besser wird.

Im Vergleich zum PHA ist der neue Test blutgruppenunabhängig und kann mit jedem Serum ohne Rücksicht auf Antikörper gegen Erythrozyten oder gegen andere

Antigene durchgeführt werden. Die beladenen Beads sind robust und können ohne Aktivitätsverlust über lange Zeit (mehr als 6 Monate) verwendet werden.

Die Ergebnisse der untersuchten Patientenseren sind in vieler Hinsicht interessant. Wie bereits in der Literatur beschrieben, werden Antikörper gegen IgA-Moleküle relativ häufig bei Patienten mit selektivem IgA-Mangel und bei Patienten mit CVID festgestellt [3,8,9,12,16,19,31,32]. In der vorliegenden Arbeit ließen sich solche Antikörper bei 45% der untersuchten Patienten mit selektivem IgA-Mangel und bei 22% der untersuchten Patienten mit CVID feststellen (Tabelle 4). Allerdings sind diese Antikörper meistens schwach und ohne klinische Relevanz. Möglicherweise sind nur hochtitrige Antikörper von klinischer Bedeutung. Drei der untersuchten Patienten hatten relativ starke Antikörper (##1,2,3; Tabelle 4) und nur eine (#1) dieser Patienten hatte anamnestisch eine anaphylaktische Reaktion nach Gabe von anti-Rh(D)-Prophylaxe. Die anderen zwei Patienten wurden bisher mit Blutprodukten nicht behandelt und die klinische Relevanz ihrer Antikörpern blieb bisher unklar.

Eine Bestimmung der Spezifität der Antikörper wurde mit dem neuen Test nur bei vier Patienten (##1,2,7,8; Tabelle 7) durchgeführt. Alle vier hatten klassenspezifische anti-IgA Antikörper. Insgesamt finden sich klassenspezifische anti-IgA Antikörper häufiger bei Patienten mit selektivem IgA-Mangel mit oder ohne weiteren Erkrankungen und subklassenspezifische bei Patienten mit CVID oder gesunden Menschen [7,37,48]. Zusammen mit der Höhe des Titors wird die Spezifität als ein Maß für die klinische Bedeutung herangezogen. In älteren Studien wiesen klassenspezifische Antikörper stets höhere Titer (bis 1:17.500 im PHA) als subklassenspezifische auf [5,6,8]. Die Titer klassenspezifischer Antikörper von Patienten mit anaphylaktischen Reaktionen waren deutlich höher als die von Patienten mit subklassenspezifischen (mittlere Titer im PHA von 1:640 bzw. 1:120) [8]. Im PHA sollen oberhalb eines Titors von 1:256 anti-IgA Antikörper für schwere Reaktionen verantwortlich gemacht werden können [12]. Ob sich diese Ergebnisse mit dem PaGIA bestätigen lassen und die Titer entsprechend angepaßt werden können, ist in weiteren Untersuchungen zu klären.

Interessanterweise waren einige Patienten in Behandlung mit i.v. IgG-Präparaten (##12-34; Tabelle 4). Obwohl es sich dabei um IgG-Präparate handelt, enthalten diese Präparate geringe IgA-Mengen. Im Gegensatz zur bisherigen Meinung hat die IgG- bzw. IgA-Substitution hier weder zu Reaktionen noch, wie anhand von Verlaufskontrollen serologisch festgestellt werden konnte, zur Verstärkung der Antikörperkonzentration im Serum geführt [48]. Die Frage, warum die Patienten mit anti-IgA keine klinisch relevanten Reaktionen durch die Substitution gezeigt haben, ist möglicherweise durch die geringe Konzentration der Antikörper bzw. der zugeführten IgA-Menge zu erklären [48]. Unabhängig davon ist aus immunologischer Sicht nicht verständlich, warum die Substitution bei diesem Patienten nicht zur Verstärkung der Antikörperbildung führt. Bei Patienten mit CVID ist dies möglicherweise durch den Immundefekt im Rahmen der Grunderkrankung zu erklären [1,6,9,16,21,22,26,27]. Dagegen kann das Phänomen bei Patienten mit selektivem IgA-Mangel nicht erklärt werden. Die Möglichkeit, daß schwache Antikörper gegen IgA durch die transfundierten IgA-Moleküle blockiert werden und deshalb die Messungen bei diesen Patienten falsche Ergebnisse anzeigen [49], ist aus unserer Sicht unwahrscheinlich. Gegen diese Vermutung sprechen die Tatsachen, daß die Antikörperkonzentrationen auch bei späteren Messungen nicht ansteigen und die betroffenen Patienten keine Reaktivierung im Sinne einer Immunkomplexerkrankung (Vasculitis) durch die Bildung von „IgA-anti-IgA-Komplexen“ entwickeln [50].

Die Behauptung, daß bei Patienten mit IgA-Mangel IgA-haltige Blutprodukte vermehrt zur Alloimmunisierung führen können [5,6,8,11], läßt sich trotz der geringen Zahl der behandelten Patienten in dieser Arbeit nicht bestätigen. Keines der behandelten Kinder mit IgA-Mangel wurde durch die Substitution mit IgG bzw. IgA sensibilisiert. Zur weiteren Abklärung dieser Fragen sind weitere Studien notwendig.

Aus unserer Sicht ist der neue Test für die Durchführung solcher Studien sehr geeignet. Im Rahmen dieser Studien können auch klinisch relevante Antikörper identifiziert werden und gegebenenfalls entsprechende Beads zum Nachweis von

nur klinisch relevanten Antikörpern hergestellt werden. Weiterhin können im Rahmen weiterer Studien die Fragen geklärt werden, ob bestimmte Patienten IgM oder IgE Antikörper gegen IgA-Moleküle bilden. Während IgM Antikörper gegen IgA-Moleküle als Ursache einer anaphylaktischen Reaktion bisher nicht beschrieben wurden, sind IgE-anti-IgA Antikörper bei zwei Patienten beschrieben worden [18,19].

Seit kurzem werden Cytokine und Chemokine als Ursachen für die meisten nicht-hämolytische Transfusionsreaktionen angesehen. Sie finden sich besonders in Blutprodukten, die nicht leukozytenfiltriert sind. Insbesondere werden IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  diskutiert, die als proinflammatorische Substanzen zu Leukozytenmigration, Aktivierung und Degranulation von Neutrophilen und Freisetzung von Histamin führen [51,52,53,54]. Experimentell konnte gezeigt werden, daß die Transfusion des Überstandes von Thrombozytenkonzentraten, die erhöhte Konzentrationen an IL-1 $\beta$  und IL-6 enthielten, febrile Reaktionen auftraten. Wurden nur die Thrombozyten selbst transfundiert, kam es deutlich seltener zu solchen Reaktionen [52]. Weiterhin sind leichte bis schwere nichthämolytische Transfusionsreaktionen bei der Gabe von Thrombozytenkonzentraten unabhängig von Leukozytenfiltration oder IL-1 $\beta$  und IL-6 Konzentrationen beschrieben worden. Dabei wurden erhöhte Konzentrationen der in den Thrombozyten synthetisierten Chemokine RANTES (Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and presumably Secreted) und MIP-1 $\alpha$  (Macrophage Inflammatory Protein) gefunden, die ähnlich wie Cytokine wirken [55].

Diese Mechanismen bieten zumindest teilweise eine Erklärung bei unklaren nichthämolytischen Transfusionsreaktionen. Es fehlt aber bisher an weiteren Untersuchungen dieser Zusammenhänge.

Zusammenfassend eröffnet der neue Test einen Weg zu Erfassung und genauen Charakterisierung von anti-IgA Antikörpern.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Die meisten transfusionsassoziierten anaphylaktischen und anaphylaktoiden Reaktionen werden auf das Vorliegen von anti-IgA Antikörpern zurückgeführt [5,6,8]. Die genaue Inzidenz ist jedoch unbekannt [6,17]. Der Nachweis dieser Antikörper war bisher schwierig und konnte nur in wenigen Einrichtungen durchgeführt werden.

Nach Entwicklung des Particle Gel Immuno Assay (PaGIA) wurden unter Verwendung von 105 Seren gesunder Blutspender Vergleiche mit der bisherigen Standardmethode der Passiven Hämagglutination (PHA) vorgenommen und es konnte gezeigt werden, daß der PaGIA hochspezifisch, praktikabel und einfach durchführbar ist. Anschließend wurden 34 Seren von Patienten mit einem IgA-Mangel bzw. kombinierten Immundefekten untersucht. In 10 Fällen konnten nur relativ schwache Antikörper (Titer 1:1 bis 1:256) gefunden werden. Anamnestisch hatte nur eine Patientin einen anaphylaktischen Schock nach Gabe von Anti-D-Prophylaxe. Der Antikörpertiter bei dieser Patientin war relativ hoch (1:256). Bei einer zweiten Patientin mit einem relativ hohen Titer wurden bis zur Untersuchung keine Blutprodukte gegeben. Somit blieb die klinische Relevanz dieses Antikörpers unklar.

Schwache Antikörper sind klinisch offensichtlich ohne Bedeutung, da einige Patienten ohne Komplikationen mit Immunglobulinen behandelt wurden [48]. Darüber hinaus ergaben die Nachuntersuchungen keinen Hinweis auf einen Titeranstieg der Antikörper.

Der Vorteil des PaGIA liegt in seiner einfachen und schnellen Durchführung und der Blutgruppenunabhängigkeit. Die Beads sind gebrauchsfertig bis zu einem Jahr haltbar. Mit der Standardausstattung des ID-Micro Typing System, das in vielen Laboratorien verbreitet ist, ist dieser Test stets in der serologischen Routinediagnostik anwendbar. Er bietet erstmals die Möglichkeit, große Zahlen an Seren zu untersuchen, um so ein genaueres Bild über anti-IgA Antikörper und ihre jeweili-

ge klinische Bedeutung zu erhalten. Insbesondere kann davon ausgehend ihre Rolle bei anaphylaktischen Transfusionsreaktionen eventuell neu bewertet werden.

## ANHANG

### LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Vyas GN, Perkins HA, Fudenberg HH: Anaphylactoid transfusion reactions associated with anti-IgA. *The Lancet*. 1968, 2: 312-315
- 2 Schmidt AP, Taswell HF, Gleich GJ: Anaphylactic transfusion reactions associated with anti-IgA antibody. *N Engl J Med*. 1969, 280: 188-193
- 3 Vyas GN, Holmdahl L et al.: Serologic specificity of human anti-IgA and its significance in transfusion. *Blood*. 1969, 34(5): 573-581
- 4 Miller WV, Holland PV, Sugarbaker E, Strober W, Waldmann TA: Anaphylactic reactions to IgA: A difficult transfusion problem. *Am J Clin Path*. 1970, 54: 618-621
- 5 Leikola J, Koistinen J et al.: IgA-induced anaphylactic transfusion reactions: A report of four cases. *Blood*. 1973, 42: 111-119
- 6 Pineda AA, Taswell HF: Transfusion reactions associated with anti-IgA antibodies: Report of four cases and review of the literature. *Transfusion*. 1975, 15(1): 10-15
- 7 Koistinen J, Leikola J: Weak anti-IgA antibodies with limited specificity and nonhemolytic transfusion reactions. *Vox Sang* 1977, 32: 77-81
- 8 Sandler SG, Eckrich R et al.: Hemagglutination assays for the diagnosis and prevention of IgA anaphylactic transfusion reactions. *Blood*. 1994, 84(6): 2031-2035
- 9 Ferreira A, Garcia Rodriguez MC et al.: Anti-IgA antibodies in selective IgA Deficiency and in primary immunodeficient patients treated with  $\gamma$ -globulin. *Clin Immunol Immunopath*. 1988, 47: 199-207



- 10 McCluskey DR, Boyd NA: Anaphylaxis with intravenous gammaglobulin. *The Lancet*. 1990, 336: 874
- 11 Cunningham-Rundles C: IgA Autoantibodies. *Autoantibodies*. Hrsg.: Peter JB, Shoenfeld Yin: 1st Edition, Amsterdam, New York: Elsevier Science B.V., 1996 417-422, ISBN 0-444-82383-2
- 12 Sandler SG, Mallory D et al.: IgA anaphylactic transfusion reactions. *Transf Med Rev*. 1995, 9(1): 1-8
- 13 Hunt A, Reed M: A simple protocol for the screening and preliminary identification of antibodies to human IgA using unpurified proteins in the passive haemagglutination test. *Vox Sang* 1990, 59: 30-33
- 14 Eckrich RJ, Mallory DM, Sandler SG: Laboratory tests to exclude IgA Deficiency in the investigation of suspected anti-IgA transfusion reactions. *Transfusion*. 1993, 6: 488-492
- 15 Strober W, Wochner RD, Barlow MH et al.: Immunoglobulin metabolism in ataxia teleangiectasia. *J Clin Invest*. 1968, 47: 1905-1915
- 16 Fudenberg HH, Gold ER, Vyas GN et al.: Human antibodies to human IgA globulins. *Immunochemistry*. 1968, 5: 203-206
- 17 Laschinger C, Sheppard FA, Naylor DH: Anti-IgA-mediated transfusion reactions in Canada. *Canad Med Ass J*. 1984, 130: 141-144
- 18 Burks AW, Sampson HA, Buckley RH: Anaphylactic reactions after gamma globulin administration in patients with hypogammaglobulinemia. *N Engl J Med*. 1986, 314: 560-564
- 19 Björkander J, Hammarström L, Smith CL et al.: Immunoglobulin prophylaxis in patients with antibody deficiency syndromes and anti-IgA antibodies. *J Clin Immunol*. 1987, 7: 8-15
- 20 Hiki Y, Saitoh M, Kobayashi Y: Serum IgA Class Anti-IgA Antibody in IgA Nephropathy. *Nephron*. 1991, 59: 552-560

- 21 Koistinen J, Sarna S: Immunological abnormalities in the sera of IgA-deficient blood donors. *Vox Sang* 1975, 29: 203-213
- 22 Petty RE, Palmer NR, Cassidy JT et al.: The association of autoimmune diseases in patients with selective IgA deficiency. *Clin Exp Immunol.* 1979, 37: 83-88
- 23 Burks AW, Steele RW: Selective IgA Deficiency. *Annals of Allergy.* 1986, 57: 3-13
- 24 Liblau RS, Bach JF: Selective IgA deficiency and autoimmunity. *Int Arch Allergy Immunol.* 1992, 99: 16-27
- 25 Salama A, Schwind P, Schönhage K et al.: Rapid detection of antibodies to immunoglobulin A molecules by using the particle gel immunoassay. *Vox Sang* 2001, 81: 45-48
- 26 Cunningham-Rundles C, Wong S, Björkander J, Hanson LA: Use of an IgA-depleted intravenous immunoglobulin in a patient with an anti-IgA antibody. *Clin Immunol Immunopathol.* 1986, 38: 141-149
- 27 Ferreira A, Garcia Rodriguez MC, Font AN: Follow-up of anti-IgA antibodies in primary immunodeficient patients treated with gamma globulin. *Vox Sang* 1989, 56: 218-222
- 28 Cunningham-Rundles C, Brandeis WE, Good RA, Day NK: Bovine antigens and the formation of circulating immune complexes in selective immunoglobulin A deficiency. *J Clin Invest.* 1979, 64: 272-279
- 29 De la Concha EG, Subiza JL, Fontán G et al.: Disorders of regulatory T cells in patients with selective IgA deficiency and its relationship to associated autoimmune phenomena. *Clin Exp Immunol.* 1982, 49: 410-418
- 30 Cunningham-Rundles C, Brandeis WE, Pudifin DJ et al.: Autoimmunity in selective IgA Deficiency: relationship to anti-bovine proteine antibodies, cir-

- culating immune complexes and clinical disease. Clin Exp Immunol. 1981, 45: 299-304
- 31 Vyas GN, Perkins HA, Yang YM et al.: Healthy blood donors with selective absence of immunoglobulin A: prevention of anaphylactic transfusion reactions caused by antibodies to IgA. J Lab Clin Med. 1975, 85: 838-842
  - 32 Sennhauser FH, Hosking CS, Jones CL et al.: Anti-IgA antibodies in IgA-deficient children. J Clin Immunol. 1988, 8: 356-361
  - 33 Strothman R, White MB et al.: HLA and IgA Deficiency in blood donors. Hum Immunol. 1986, 16: 289-294
  - 34 Strothman RA, Sedestrom LM, Ball MJ, Chen SN: HLA association of anti-IgA antibody production. Tissue Antigens. 1989, 34: 141-144
  - 35 Gold ER, Fudenberg HH: Chromic chloride: A coupling reagent for passive hemagglutination reactions. J Immunol. 1967, 99: 859-866
  - 36 Goding JW: The chromic chloride method of coupling antigens to erythrocytes: Definition of some important parameters. J Immunol Meth. 1976, 10: 61-66
  - 37 Hammarström L, Person M, Smith C: Anti-IgA in selective IgA deficiency: In vitro effects and Ig subclass pattern of human anti-IgA. Scand J Immunol. 1983, 18: 509-513
  - 38 Berber H, Lapierre Y, Hitzler W et al.: Gel Centrifugation Test: A comparative study of a new method in red blood serology. First ISBT Regional Congress of the European Region, Lugano 7.-10.5.1989. Hrsg.: Publikation der ISBTin: Arnette Verlag, 1989 341-352
  - 39 Lapierre Y, Rigal D et al.: The gel test: A new way to detect red cell antigen-antibody reactions. Transfusion. 1990, 1: 109-113
  - 40 Hitzler W, Johanson C et al.: Vergleichsstudie zur Antikörperidentifizierung im Gelzentrifugationstest (ID-Micro Typing System), Festphasen-

- Antiglobulintest (Solidscreen, Capture R, Ready ID) und Röhrchentest. Beitr Infusionsther. 1992, 30: 370-374
- 41 Kretschmer V, Heuckeroth A et al.: Superiority of gel centrifugation in antibody screening and identification. Infusion Therapy. 1992, 19: 226-230
- 42 Lynen L, Sadlowski S, Neumeyer H: Nachweis der Überlegenheit des Gel-Zentrifugationstests im Vergleich zum Liss/Coombs-Röhrchen-Test bei der Untersuchung von Erythrocyten-Antikörpern der IgG-Klasse. Laboratoriumsmedizin. 1992, 16: 255-261
- 43 Scott Y, Parker P et al.: Comparison of plasma and serum for antibody detection using DiaMed microtubes. Transf Med. 1996, 6: 65-67
- 44 Nathalang O, Chuansumrit A et al.: Comparison between the conventional tube technique and the gel technique in direct antiglobulin tests. Vox Sang 1997, 72: 169-171
- 45 Haun M, Wasi S: Biotinylated antibodies bound to streptavidin beads: a versatile solid matrix for immunoassays. Anal Biochem. 1990, 191(2): 337-342
- 46 Schwind P, Bashforth D, Hobbs R et al.: Synthetische Partikel als Agglutinationsreagenzien. Band EP 0 849 595 A1. Den Haag: Europäisches Patentamt, 24.06.1998 - Patentblatt 1998/26
- 47 Radu I, Mihalache D: Detection of soluble antigens by the reverse passive haemagglutination assay. Romanian Arch Microbiol Immunol. 1992, 51(4): 205-212
- 48 de Albuquerque Campos R, Notomi Sato M, da Silva Duarte AJ: IgA anti-IgA subclasses in common variable immunodeficiency and association with severe adverse reactions to intravenous immunoglobulin therapy. J Clin Immunol. 2000, 20: 77-82

- 49 Pan Q, Hammarström L: Regarding 'Rapid detection of antibodies to immunoglobulin A molecules by using the particle gel immunoassay' by Salama et al. Vox Sang 2001, 82: 84
- 50 Salama A: Author's reply. Vox Sang 2001, 82: 84-85
- 51 Smith KJ, Sierra ER, Nelson EJ: Histamine, IL-1 $\beta$  and IL-8 increase in packed RBCs stored for 42 days but not in RBCs leukodepleted pre-storage (abstract). Transfusion. 1993, 33 (*Suppl*): 53S
- 52 Heddle NM, Klama L, Singer J et al.: The role of the plasma from platelet concentrates in transfusion reactions. N Engl J Med. 1994, 331: 625-628
- 53 Stack G, Baril L, Napychank P, Snyder EL: Cytokine generation in stored, white cell-reduced, and bacterially contaminated units of red cells. Transfusion. 1995, 35: 199-203
- 54 Bubel S, Wilhelm D, Entelmann M, Kirchner H, Klüter H: Chemokines in stored platelet concentrates. Transfusion. 1996, 36: 445-449
- 55 Klüter H, Bubel S, Kirchner H, Wilhelm D: Febrile and allergic transfusion reactions after the transfusion of white cell-poor platelet preparations. Transfusion. 1999, 39: 1179-1184
- 56 Ammann AJ, Hong R: Selective IgA deficiency: presentation of 30 cases and a review of the literature. Medicine. 1971, 60: 223
- 57 Ammann AJ, Hong R: Disorders of the IgA System. Immunologic Disorders in Infants and Children. Hrsg.: Stiehm ER, Fulginiti VA, Saunders, 1980, 260
- 58 Abbas AK: Cellular and molecular immunology. 3rd Edition, Philadelphia: W.B. Saunders, 1997, 244, ISBN 0-7216-4024-9
- 59 Briere F, Bridon JM et al.: Interleukin 10 induces B lymphocytes from IgA-deficient patients to secrete IgA. J Clin Invest. 1994, 1: 97-104

- 60 Cassidy JT, Oldham G, Platts-Mills TAE: Functional assessment of a B cell defect in patients with selective IgA deficiency. *Clin Exp Immunol.* 1979, 55: 296-305
- 61 Cataldo F, Marino V et al.: Celiac disease and selective immunoglobulin A deficiency. *J Ped.* 131-1997, 2: 306-308
- 62 Coffman RL , Lebman DA, Shrader B: Transforming growth factor beta specifically enhances IgA production by lipopolysaccharide-stimulated murine B lymphocytes. *J Exp Med.* 1989, 170: 1039-1044
- 63 Defrance T, Vanbervliet B, Briere F et al.: Interleukin 10 and transforming growth factor beta cooperate to induce anti-CD40-activated native human B cells to secrete immunoglobulin A. *J Exp Med.* 1992, 175: 671-682
- 64 Harriman GR, Bradley A et al.: IgA Class Switch in I alpha Exon-deficient Mice: Role of Germline Transcription in Class Switch Recombination. *J Clin Invest.* 1996, 97(2): 477-485
- 65 Inoue T, Okubo H, Kudo J et al.: Selective IgA deficiency: Analysis of Ig production in vitro. *J Clin Immunol.* 1984, 4: 235-2241
- 66 Islam KB, Baskin B, Nilson L et al.: Molecular analysis of IgA deficiency. Evidence for impaired switching to IgA. *J Immunol.* 1994, 152: 1442-1452
- 67 Jandl JH, Simmonds RL: The agglutination and sensitization of red cells by metallic cations: Interactions between multivalent metals and the red cell membrane. *Brit J Haematol.* 1957, 3(1): 19-38
- 68 Janeway CA: Das molekulare Arsenal des Immunsystems. in: *Spektrum der Wissenschaft SPEZIAL 2: Das Immunsystem.* 2. Auflage, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 1997, 26-33, ISSN 0943-7096
- 69 Meyer O, Salama A, Pittet P, Schwind P: Rapid detection of heparin-induced platelet antibodies with particle gel immunoassay (ID-HPF4). *The Lancet.* 1999, 354: 1525-1526

- 70 Mitsuya H, Tomino S et al.: Evidence for the failure of IgA specific T helper activity in a patient with immunodeficiency with hyper IgM. *J Clin Lab Immunol.* 1979, 2: 337-342
- 71 Miwa Y, Negishi M, Hanaoka R et al.: A case report of selective IgA deficiency in rheumatoid arthritis and anti-IgA antibody induced anaphylactic transfusion reaction. *Ryumachi.* 1998, 38(5): 735-740
- 72 Mohabir LA, Rees TJ: Screening for IgA Deficiency on the Olympus PK 7100 by haemagglutination inhibition. *Transf Med.* 1995, 5: 275-279
- 73 Muylle L, Joos M, Wouters E et al.: Increased tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleukin 1 and interleukin 6 (IL-6) levels in the plasma of stored platelet concentrates: relationship between TNF $\alpha$  and IL-6 levels and febrile transfusion reactions. *Transfusion.* 1993, 33: 195-199
- 74 Nell PA, Amman AJ, Hong R et al.: Familial selective IgA deficiency. *Pediatrics.* 1972, 49: 71
- 75 Nishiya K, Sakai N, Terada K et al.: Detection of anti-IgA alloantibody in a case of non-hemolytic transfusion reaction. *Rinsho Ketsueki.* 1999, 40(3): 236-239
- 76 Oen K, Petty RE, Schroeder ML: Immunoglobulin A deficiency: Genetic studies. *Tissue Antigens.* 1982, 19: 174
- 77 Peter HH: Primäre Immundefekte. in: *Klinische Immunologie.* Hrsg.: Peter HH, Pichler WJin: 2. Auflage, München: Urban & Schwarzenberg, 1996, 197-199, ISBN 3-541-14892-6
- 78 Rogers RL, Javed TA, Ross RE et al.: Transfusion management of an IgA deficient Patient and with anti-IgA and incidental correction of IgA deficiency after allogeneic bone marrow transplantation. *Am J Hematol.* 1998, 57(4): 326-330

- 79 Schubert E: Immunsystem. in: Medizinische Physiologie. Hrsg.: Schauf CL, Moffett DF, Moffet SB, Schubert E, 1.deutsche Auflage, Berlin, New York: de Gruyter, 1993, 560-585, ISBN 3-11-011022-9
- 80 Schulenburg BJ, Plapp FV, Rachel JM: A rapid screening test for detection of IgA Deficiency. Transfusion. 1991, *31*(7): 633-635
- 81 Schwind P, Brodard M et al.: Particle Gel Immuno Assay (ID-PaGIA): A new immuno assay format. in: New dimensions for gel test procedures. Hrsg.: Satellite Symposium during the ISBT Meetingin: Frankfurt: 1997, 18-26
- 82 Sonada E, Matsumoto R, Hitoshi Y et al.: Transforming growth factor beta induces IgA production and acts additively with interleukin 5 for IgA production. J Exp Med. 1989, *170*: 1415-1420
- 83 Stewart MW, Etches WS, Russell AS et al.: Detection of Antiphospholipid Antibodies by Flow Cytometry: Rapid Detection of Antibody Isotype and Phospholipid Specificity. Thromb Haem. 1993, *70*: 603-607
- 84 Stewart MW, McKay T, Schwind P, Gordon PA: Rapid Detection of Anticardiolipin Antibodies. Am J Hematol. 1998, *57*: 315-319
- 85 Stryer L: Antikörper und T-Zell-Rezeptoren. Biochemie. Hrsg.: Stryer Lin: 4. deutsche Auflage, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 1996, 381-407, ISBN 3-86025-346-8
- 86 Vyas GN, Perkins HA: Anti-IgA in blood donors. Transfusion. 1976, *16*: 289
- 87 Waldmann TA, Broder S, Krakauer R et al.: Defect in IgA secretion and in IgA specific suppressor cells in patients with selective IgA deficiency. Trans Assoc Am Phys. 1976, *89*: 215-244



**DANKSAGUNG**

Herrn Professor Abdulgabar SALAMA danke ich die Überlassung und Betreuung des Themas. Trotz mancher „Schwunglosigkeit“ ermahnte und ermunterte er mich immer wieder und behielt Weitblick - letztlich sogar über 4.500 Meilen hinweg...

Ramona GENTH arbeitete mich in die Methoden ein und zeigte mir stets Tips und Kniffe. Wenn mir die Ideen ausgingen, hatte sie oft noch ein Ass im Ärmel. Insbesondere ihr umfassendes Wissen der angrenzenden Bereiche der Immunhämatologie gaben mir viel Ruhe. Souveränität gepaart mit Kompetenz haben mich schwer beeindruckt!

Petra MOSCHANSKY stand mir genauso bei den alltäglichen Problemen zur Seite. Immer um eine gute Idee bemüht, ging so vieles leichter von der Hand.

Und der Café der beiden war unendlich besser als jeder andere in der Blutbank!

Dank allen anderen Laborantinnen und Laboranten sowie Zivildienstleistenden, die mir Türen und Tore geöffnet haben. Vieles war so selbstverständlich und unkompliziert.

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

CVID	Common Variable Immuno Deficiency
dl	Deziliter
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
g	hier für: Gravity
HLA	Human Leucocyte Antigen
Ig	Immunglobulin(e)
i.v.	intravenös
LISS	Low Ionic Strength Solution
M.	Morbus
mg, ml	Milligramm, -meter
µg, µl, µm	Mikrogramm, -liter, -meter
NaCl	Natrium Chlorid (-Lösung)
n.b.	nicht bekannt
nm	Nanometer
n.t.	nicht getestet
PaGIA	Particle Gel Immuno Assay
PBS	Phosphate Buffered Saline
PHA	Passive Hemagglutination Assay
RIA	Radio Immuno Assay
sDIgA	selective Deficiency of IgA
UpM	Umdrehungen pro Minute

## VERÖFFENTLICHUNGEN

### Artikel

Salama A, Schwind P, Schönhage K, Genth R, Cotting C, Hustinx H, Krieg R, Nydegger U, Aebischer I: Rapid detection of antibodies to immunoglobulin A molecules by using the particle gel immunoassay. Vox Sang 2001; 81/1: 45-48

### Poster

K Schoenhage, DJ Visintine, M Castellon, D Schwartz, RD Minshall: Protective effect of dexmedetomidine on LPS induced increase in albumin permeability and lung injury. MARC 2005, Madison, USA

K Schönhage, P Ziemann-Gimmel, J Newman, B Pygon: Anesthetic Management of Liver Donors for Adult Living Related Liver Transplants. Living donor abdominal organ transplantation: state of the art, 2<sup>nd</sup> international conference, 2004, Taormina, Italien

K Schönhage, HM Koenig: Unanticipated difficult airway secondary to dislodged cervical spine hardware. MARC 2003, Chicago, USA

Schönhage K, Aebischer I, Genth R, Schwind P, Salama A: Detektion von Antikörpern gegen IgA mit dem Particle Gel Immunoassay (ID-PaGIA), 32. Kongress der DGTI 1999, Münster/Westfalen

## LEBENS LAUF

Name: Kai Oliver Schönhage

Geburtsdatum und -ort: 22. April 1972 in Bielefeld

Staatsangehörigkeit: deutsch

1991, Juni Abitur am Gymnasium Leopoldinum Detmold/NRW

1991, Okt. Studium der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin

1995, Okt. Wechsel an die Humboldt Universität zu Berlin

1998, Okt. dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung und Teilapprobation

1999, März- Arzt im Praktikum in der Abteilung für Allgemein- und Gefäß-

2000, Sep. chirurgie des KH Zehlendorf, Berlin und Vollapprobation

2000, Dez.- Assistenzarzt in der Abteilung für Anaesthesiologie und operative

2001, Juli Intensivmedizin des UK Benjamin Franklin der FU Berlin

2001, Aug. Zurückzug des Promotionsverfahrens der vorigen Fassung der hier vorliegenden Arbeit

seit Aug. 2001 Assistenzarzt (Physician Resident) im Department of Anesthesiology, University of Illinois at Chicago (UIC), Chicago/USA

## **ERKLÄRUNG an EIDES STATT**

Hiermit erkläre ich, daß die vorliegende Arbeit von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfaßt wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Chicago, 25. Mai 2004

Kai Schönhage